

血清 NEFA 測定のための試料の諸問題について

岡山赤十字病院臨床検査部（部長 上原偉男）

藤井 久子 川 西 孝 文屋 誠二 小出佐知子
西原 清女 香川 勝彦 川上 公枝

緒 言

1956年 Ayers は、遊離脂肪酸（以下 NEFA と略す）の Cu 塩が、選択的にクロロホルム中に移行することを見出した、その後、この原理を応用した NEFA の比色定量法が、岩山（1959）、Duncombe（1963）、Itaya（1965）等により、種々改良が加えられ、現在では、手技が簡単で、特別の器具を必要としない方法として広く用いられている。又、最近では、ビリルビンの影響を受けないといわれている Elphic（1968）、Laurell 法（1968）についても検討が加えられている。

従来より、血清 NEFA の測定に当つては、試料は採血後、速かに処理する必要があると言われており、又、NEFA は半減期も短かく、食事、その他の生理的な条件によつて、著しく変動すると言われている。

私達は、今回、測定法として Itaya-Ui 法を用い、NEFA 測定のための試料は、どのように扱えば再現性のよい結果を得られるかを、探索する目的で、採血後の試料の経時変化を、保存の条件を変えて観察し、食後及び1日の遊離脂肪酸の変動を測定した。更に測定に当つて、Itaya-Ui 法を使用したので、ビリルビンの影響も見た。

測定方法の検討

測定方法は、Itaya-Ui法を使用した。本法は、クロロホルム中の NEFA の Cu 塩を、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムで、発色させており、従来から、クロロホルム層の分離の時の Cu の混入、発色の際の器具の汚染等により、プラス誤差を招きやすいと言われている。私達は、今回の検討を進めるに当つて、できるだけ誤差の少ない方法を探索する目的で、表1のような検討を

表1 手技の検討

操 作	実施前 C.V.	実施後 C.V.
器具の 5%-HCl 洗滌	6.2%	4.8%
クロロホルム層分離に 注射針使用	7.7%	4.9%
発色前操作の濾過	3.6%	5.3%
銅液除去のため遠心2回	3.6%	5.6%

した。その結果、器具は5%一塩酸で処理した方がよく、クロロホルム層の分離に当つては、2500 r.p.m. 10分間、1回遠心した後、Cu 溶液を吸収除去し、管壁についた Cu 溶液に注意しながら、注射針で採取する方法について、よい結果を得、その時 Itaya-Ui 法の C.V. は 4.9% となった。ビリルビンの検討の際に対照として実施した Elphick 法、Wako-Kit 法についても、同様に処理したところ、C.V. はそれぞれ、4.2%、3.7% を示した。

検討及び結果

1. 採血後、試料が、どの程度、保存し得るかをみるため、血漿に分離した状態、全血液の状態に分け、血漿では、25°C 5°C、氷水中、

図1 血漿 NEFA 値の経時変化
—血漿分離後保存—

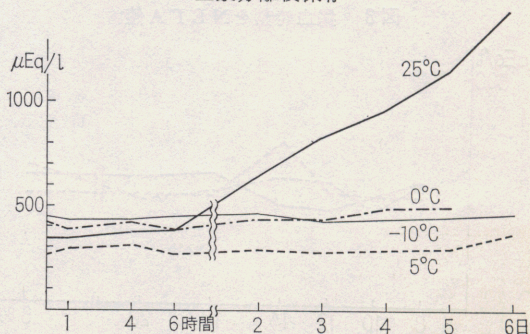
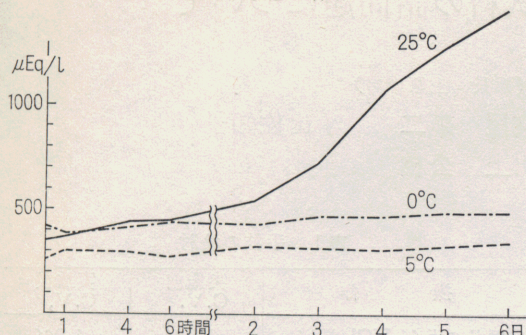


図2 血漿NEFA値の経時変化
—全血液状態で保存—



—10°C, 全血液では, 25°C, 5°C 氷水中の条件で, それぞれ保存し, 試料の経時変化を観察した. その結果, 図1及び図2に示すような結果を得た. 即ち, 血漿に分離した状態で, 図1のように, 25°Cでは, 第1回の測定後, 時間と共に徐々に増加し, 6時間で約10%の増加を示し, 24時間以降は著しく増量していた. —10°C, 5°Cでは, かなりよく安定し, 0°Cでは24時間以後, 徐々に増加した. —10°Cでは7日間, ほとんど変化は, みられなかつた. 又, 試料を全血のまま放置し, 経時変化を測定した時, 図2のように25°Cでは顕著な増加を示し, 氷水中, 5°Cでも, 血漿に分離した場合にくらべて, 徐々に増加する傾向を示した. 24時間後, 0°C, 5°C共に10~20%増加していた.

2. NEFAは, 1日の変動が大きく, 採血時の条件によつて, かなり異なつた値を示すと言われている. 採血時刻によつて, どの程度, 変化するかを, 3例の軽作業をしている, 健康人につ

図3 採血時刻とNEFA値

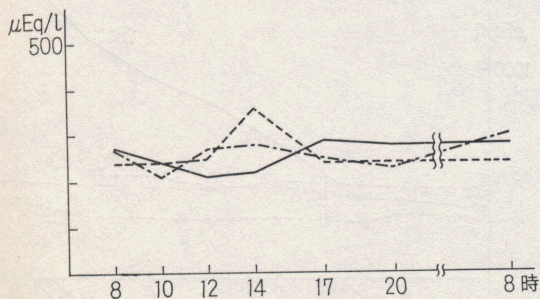
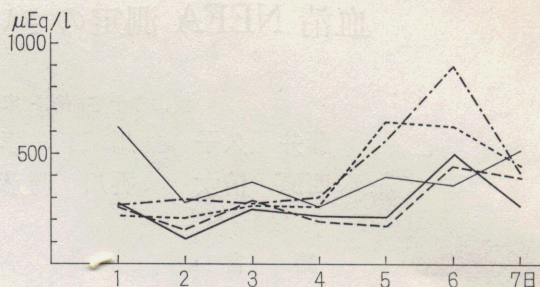


図4 早朝空腹時NEFA値の採血日による違い



いて, 8時, 12時, 17時に, それぞれ, 食事をとり, 測定し, その結果を図3に示した. 1日のうちでNEFAの変動は, 人によつて異なり, 最も大きな変動では, 100μEq/l の差を示すものがあった. その他では, ほぼ80μEq/l 程度の変動があった.

3. 採血日によつても, 変化するのではないかと思ひ, 5例の健康人について, 早期空腹時の, NEFA値を, 7日間, 連続して測定し, 図4に示した. NEFA値は採血日によつて, かなり大きく変動することが, わかつた.

最高値と, 最低値の差は, 最も大きなもので 630μEq/l の値を示し, 最も小さなもので, 290μEq/l の値を示した.

4. NEFAは, 食事によつて血糖値とは逆に, 食後, 時間と共に, 減少すると言われている. 私達も, 健康人と, 糖尿病群について, 食前, 及び食後, 3時間までの, NEFA値を測定した. 健康人(10例)では, 食後, 1~2時間で, 最低値を示すものが多いのに比べ, 糖尿病群(10例)では, 3時間でも徐々に, 低下を示すものが多くみられた. これは今迄, 諸家により報告されている結果と一致し, 耐糖検査における血糖値と, ほぼ, 対照的な変動を示した.

5. Itaya-Ui 法では, 黄疸血清の場合, 抽出液に, ビルビンの色調が移行し, 測定値にプラス誤差を与えられている. ビルビン濃度既知の試料について, ビルビンの抽出される量と, Itaya-Ui 法の測定値, 及びビルビンの影響のない Elphick 法による測定値を同時

表2 血清ビリルビン濃度とNEFA値(低ビリルビン)

No.	ビリルビン濃度		Itaya-Ui 法 ①		Elphic 法② NEFA値	①法—②法 NEFA値
	総	間 接	発色前吸光度	NEFA値		
1	1.0mg/dl	0.4mg/dl	0.004	380 μ Eq/l	440 μ Eq/l	— 60 μ Eq/l
2	0.8	0.2	0.009	620	560	+ 60
3	0.5	0.2	0	490	570	— 80
4	0.4	0.3	0.009	200	280	— 80
5	0.6	0.2	0	190	240	— 50
6	0.4	0.2	0.004	580	700	— 120
7	0.9	0.3	0.009	460	490	— 30
8	0.9	0.4	0.009	480	470	+ 10

表3 血清ビリルビン濃度とNEFA値(高ビリルビン)

No.	ビリルビン濃度		Itaya-Ui 法 ①		Elphic 法② NEFA値	①法—②法 NEFA値
	総	間 接	発色前吸光度	NEFA値		
1	1.4mg/dl	0.4mg/dl	0.027	620 μ Eq/l	600 μ Eq/l	+ 20 μ Eq/l
2	7.0	1.0	0.013	580	580	0
3	2.2	1.2	0.034	440	370	+ 70
4	8.3	1.3	0.022	1000	680	+ 320
5	4.5	2.0	0.022	570	530	+ 40
6	6.0	3.3	0.084	580	400	+ 180
7	13.5	3.0	0.022	740	610	+ 130
8	8.5	7.0	0.084	530	440	+ 90

に示しいのが、表2、3である。表2は、ビリルビン濃度の低い試料について、表3は、ビリルビン濃度の高い試料について示した。Itaya-Ui 法から、Elphick 法の測定値を差し引いた値で見ると、高ビリルビン血清のときに、Itaya-Vi 法で高く測定される傾向がある。私達は、発色前の吸光度を測定することによつて、ビリルビンの抽出される量を見たところ、直接ビリルビンよりも、間接ビリルビンが高い血清について、よく抽出されるように思われた。しかし、測定されるNEFAの誤差と、抽出されるビリルビン濃度とは、比例しないので、発色の際にビリルビンが変化しているのではないかと思ひ、実験的に、間接ビリルビンをクロロホルムに溶かし、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムのn-ブタノール溶液を加えたところ、吸光度が減少することを見出した。加える発色剤の量には、ほとんど関係なく、ビリルビンの濃いものでも、かなり、吸

光度が減少した。しかし、減少の割合は一定でなく、ビリルビン濃度による補正はできなかった。

7. 溶血した場合、血漿と血球のNEFAの濃度の割合が異なれば溶血の誤差も考えられると思ひ、同一試料について血漿と血球のNEFA値を測定したところ、10例の平均についてそれぞれ、536 μ Eq/l, 200 μ Eq/lの値を得た。

8. 健康人の、早朝空腹時のNEFA値を測定した。 $\bar{X} \pm \sigma$ で430 \pm 198 μ Eq/lとなり、21～50才までに年齢による顕著な変化は見られなかった。

考 按

1. 採血後、試料は、氷水中に置き、できるだけ早く血漿に分離した後、冷蔵庫で、3～5日間、フリーザー中で、7日間位安定していた。

2. 1日の内の生理的変動は、大きいもので、100 μ Eq/l程度の差を示し、ほとんど、80 μ Eq/l

程度だった。

3. 早朝空腹時の採血においても、採血日によつてかなり大きく変動する。最も大きなもので $630\mu\text{Eq/l}$ 最も小さなもので $290\mu\text{Eq/l}$ の値を示した。

4. 食後、短時間に NEFA 値は、減少していた。

5. 高ビリルビン血清において、Itaya-Ui 法で、Elphick 法、Wako-Kit 法に比べて、低ビリルビン血清よりもやや高く判定される傾向がある。

6. 血球中 NEFA は、血漿中 NEFA の、30~50% を示していた。

結 語

血清 NEFA 測定の際、試料は、生理的条件下の出来るだけ一定した早朝空腹時に採血することが望ましく、一回のみの測定でなく、反復実施するのがよいように思われた。採血後、試料の保存については、氷水中に採血したのち、速かに、

血清に分離したのち、フリーザーに保存すれば、かなり安定していることがわかつた。健康人測定値に、年齢による差はみられず、平均 $430 \pm 198\mu\text{Eq/l}$ となつた。Itaya-Ui 法は、黄疸血清において、Elphick 法、Wako-kit 法より高く測定されたが、ビリルビン濃度による補正式は、作り得なかつた。

(本論文要旨は、第19回、日本衛生検査学会シンポジウムに、発表した。

最後に、本研究に御指導と、御校閲を戴いた、当院臨床検査部長、上原偉男博士に、深謝致します。)

参考文献

- 1) Itaya, K. and Ui M.: J. Lipid 16: 6, 1965.
- 2) 小山勝一: 臨床病理, 474, 13, 1965.
- 3) Novak, M.: J. Lipid Research 431: 6, 1965.
- 4) Laurell, S. & Tibbling, G.: Clin. Chem. Acta 57: 16, 1966.
- 5) Elphick, M.C.: J. Clin. Path 567: 21, 1968.
- 6) 高橋善弥太: 日本臨床, 802, 27, 1969.
- 7) 川出真坂, 奥山理: 臨床検査, 574, 13, 1969.